

## Ultrastructure des racines de *Vetiveria zizanioides* (L.) Stapf (*Gramineae*)

J. VIANO, J. SMADJA, J. Y. CONAN & E. M. GAYDOU

**Résumé :** L'ultrastructure des cellules des racines de *Vetiveria zizanioides* cultivé dans l'île de la Réunion a été examinée au microscope électronique. La présence d'huiles essentielles en grande quantité dans certaines cellules a nécessité quelques modifications dans les techniques d'inclusion nécessaires à la réalisation de coupes anatomiques ultrafines. Des cristaux d'huiles essentielles ont été détectés dans l'écorce interne au sein du parenchyme cortical où s'observent notamment de remarquables lacunes lysigènes tout à fait caractéristiques de la racine de Vétiver. De plus, de nombreuses bactéries ont été identifiées dans ces cellules parenchymateuses. Ces bactéries paraissent même coexister avec les cristaux d'huiles essentielles dans les cellules du parenchyme cortical jouxtant l'endoderme.

**Summary :** The ultrastructure of root from *Vetiveria zizanioides*, which is cultivated on the Reunion island, has been examined under electron microscope. The abundant presence of essential oils in the cells has involved modifications in the inclusion techniques used to obtain ultrafine sections. Essential oils crystals were detected in the inner bark, within the cortical layer. In the latter, lysigen lacunae were also observed, which are characteristic of the Vetiver root. Moreover, numerous bacteria have been identified in these parenchymatous cells. It seems that these bacteria coexist with essential oils crystals in the cells of the cortical layer close to the endodermis.

*J. Viano, Laboratoire de Systématique, Ecophytochimie générale, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme, Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille Cédex 13, France.*

*J. Smadja et J. Y. Conan, Laboratoire de Chimie Organique, Université de la Réunion, B.P. 5, 97490 Sainte-Clotilde, France.*

*E. M. Gaydou, Laboratoire de Phytochimie, ESCM, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme, Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille Cédex 13, France.*

Les études relatives à la composition chimique de l'huile essentielle du Vétiver (*Vetiveria zizanioides* Stapf ou *Andropogon muricatus* Retz) sont nombreuses et montrent que cette essence est particulièrement complexe. Nous citerons pour mémoire les mises au point de GARNERO (1971), et les recherches plus récentes de SMADJA, GAYDOU, LAMATY & CONAN (1986, 1988) qui font la synthèse des connaissances actuelles sur la structure des principaux constituants de cette huile essentielle.

Dans le cas du Vétiver, la partie intéressante de la plante est constituée par les racines dont l'hydrodistillation permet d'obtenir l'huile essentielle.

Si, pour certaines plantes à huiles essentielles comme les lavandes et lavandins (PERRIN & COLSON, 1986) ou la sauge sclarée (COLSON et al., 1985), l'appareil producteur d'essence (situé dans la partie aérienne de la plante) a pu être étudié avec des techniques modernes



d'investigation, il n'en est pas de même pour les racines de Vétiver. En effet, nous avons relevé dans la littérature un seul article (KARTUSCH & KARTUSCH, 1978) concernant la localisation des cellules sécrétrices des huiles essentielles dans la racine du Vétiver provenant du Guatemala.

Nous nous proposons dans cette étude de présenter les premiers résultats que nous avons obtenus sur la structure et le contenu des cellules sécrétrices d'essences des racines du Vétiver bourbon.

Afin de réaliser une étude détaillée de la structure anatomique de la racine et plus précisément des cellules sécrétant les essences, nous avons tout d'abord, procédé à un examen en microscopie optique. Cette première approche a permis de visualiser l'ensemble des cellules. Dans un deuxième temps, nous avons fait appel à la microscopie électronique pour mettre en évidence les contenus cellulaires.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons de racine de Vétiver proviennent de l'île de la Réunion et ont été envoyés par avion par J. SMADJA.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la réalisation de coupes anatomiques fines, semi-fines et ultrafines nécessaires pour des observations en microscopie optique ou électronique.

### TECHNIQUES DE MICROSCOPIE OPTIQUE

Divers échantillons de racines de diamètre différent ont été prélevées et fixées dans un mélange en parties égales des solutions A et B de CRAF pendant au moins 24 h. Des inclusions dans la paraffine ont été ensuite réalisées à partir de ces racines qui ont subi au préalable une déshydratation dans divers bains alcooliques. Le matériel a été ensuite soumis à plusieurs colorants : hématoxyline, safranine, bleu d'aniline.

### TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

La fixation du matériel végétal était double : glutaraldéhyde + paraformaldéhyde. On a utilisé 3 % de glutaraldéhyde et 2 % de paraformaldéhyde ajusté à pH = 7,4 en tampon cacodylate de sodium (0,67M) à + 4° C pendant 3 heures. Après un lavage, on a réalisé une post fixation au tétroxyde d'osmium suivie d'un deuxième lavage et d'une déshydratation dans une série de bains d'éthanol. Deux types d'inclusion ont été pratiqués successivement :

— en résine époxy selon LUFT (1961)

— en lowicryl (K4M) selon ALTMAN, SCHNEIDER & PAPERMASTER (1984).

En effet, nous avons rencontré des difficultés lors de la confection des coupes résultant de la technique d'inclusion en résine époxy. Souvent les coupes étaient incomplètes du fait de la disparition externe de l'écorce. Etant donné que ces coupes renferment des quantités importantes d'huiles essentielles, elles deviennent fragiles après des bains successifs prolongés dans des solutions alcooliques.

La résine en époxy, qui a le mérite de bien conserver les structures nécessite néanmoins une déshydratation poussée, et de ce fait, abîme les protéines et les lipides cellulaires. Ceci nous a amené à modifier la technique d'inclusion et à choisir une résine hydrosoluble de lowicryl qui altère beaucoup moins les protéines et les lipides cellulaires.

Lors de l'inclusion en résine époxy la détection des phospholipides a été réalisée à partir de la technique de BUNGENBERG DE JONG & SAUBERT (1936) adaptée par DERMER (1969).

La confection des coupes a nécessité l'emploi d'un ultramicrotome « LKB » (Ultratome V) avec des couteaux de verre pour les coupes semi-fines de 0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et un couteau de diamant « Diatomé » pour les coupes ultrafines de 600 à 1800 nm. Ensuite, ces coupes ont été recueillies sur des



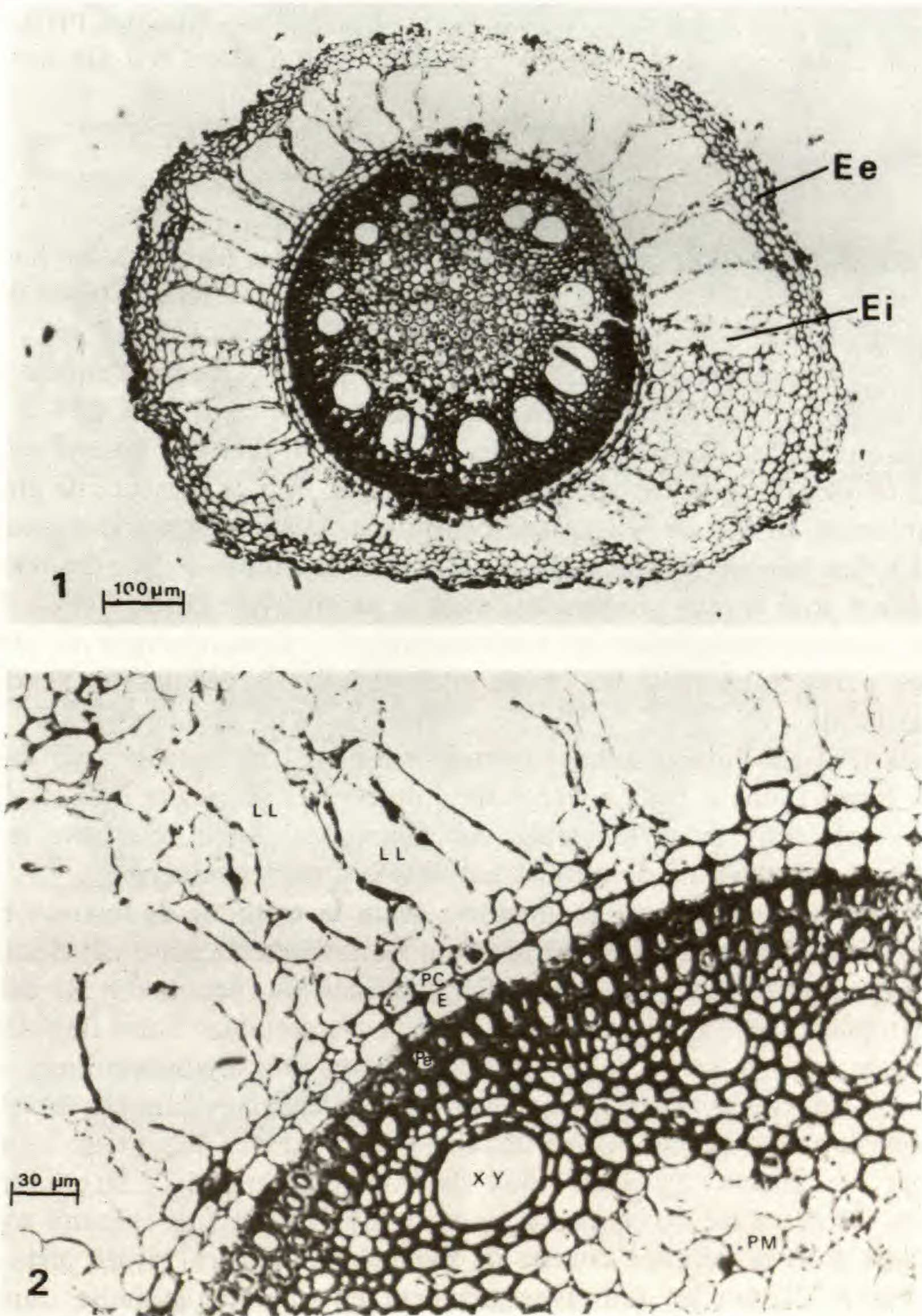


Fig. 1. — 1, section transversale d'une racine de *Vetiveria zizanioides* après traitement à la paraffine et coloration à l'hématoxyline, safranine et bleu d'aniline, vue générale de la coupe au microscope optique ; 2, vue détaillée au microscope optique de la coupe précédente montrant une partie de l'écorce interne avec des lacunes lysigènes (LL) au sein du parenchyme cortical (PC) et l'endoderme (E) ainsi que le cylindre central avec le péricycle (Pe), le xylème (XY) et le parenchyme médullaire (PM).



grilles en cuivre « mesh 200 » nues pour les observations au microscope électronique à transmission (MET). Les coupes semi-fines ont été colorées en bleu Azur et montées au Depex (Gurr) pour l'observation au microscope photonique. Les coupes ultra-fines ont été contrastées par l'acétate d'uranyle selon WATSON (1958) pendant 20 minutes, en boîte humide à température ambiante, puis par le citrate de plomb selon REYNOLDS (1963) pendant 10 minutes, en enceinte sèche.

L'examen des coupes a été réalisé sur un microscope électronique à transmission PHILIPS EM 400 T du Service commun de Microscopie électronique de la Faculté des Sciences et Techniques de Marseille Saint-Jérôme.

## RÉSULTATS

L'examen des microphotographies (Fig. 1, 1, 2) de coupes transversales fines réalisées à partir de techniques à la paraffine nous a permis de visualiser les différents tissus dont voici une description succincte.

Les cellules du rhizoderme forment des poils discontinus. L'écorce montre une différenciation en écorce externe (Ee) et interne (Ei). L'écorce externe est formée de 4 à 5 couches de cellules dont la forme et la taille présentent peu de variation. L'écorce interne est formée de 8 à 10 couches de cellules d'aspect très différent. En effet, on note la présence de grandes cellules qui sont probablement en état de lyse et qui forment par la suite de grandes lacunes lysigènes (Fig. 2, 1, 2, LL). Ces lacunes sont séparées par des files de cellules ou par des restes cellulaires écrasés. Ces lacunes sont situées uniquement dans le parenchyme cortical (PC). La couche la plus interne du parenchyme cortical est l'endoderme (E). Il est marqué par des bandes de Gaspary sur les parois anticlines. En coupe transversale, les cellules de l'endoderme sont jointives et sans méat.

Le péricycle (Pe) est fait de cellules pentagonales ou hexagonales avec des parois peu épaissies. Il est formé d'une à trois couches de cellules. Les vaisseaux de bois (XY) les plus faciles à repérer sont ceux du métaxylème. Au centre de la stèle se trouve le parenchyme médullaire (PM). Il est constitué de cellules amylofères à parois minces.

L'examen des coupes semi-fines et ultrafines selon la méthode de fixation et d'inclusion dans l'epon de DERMER montre un empilement de cellules en majorité vides. En effet, la presque totalité des cellules constituant les différents tissus de l'écorce ont été débarrassées de leur contenu cytoplasmique. Par contre, l'observation de certaines fibres de sclérenchyme du cylindre central a mis en évidence la présence d'organites cytoplasmiques tels que des mitochondries et l'ergastoplasme (Fig. 2, 3, 4). On peut donc en déduire que la technique de fixation et d'inclusion utilisée, peut, dans certains cas, conserver le contenu cellulaire.

La présence de cristaux très denses aux électrons correspondant aux huiles essentielles sécrétées par les racines a été notée sur de nombreuses coupes. Ces cristaux sont particulièrement abondants dans la dernière couche de parenchyme cortical située juste au-dessus de l'endoderme (Fig. 3, 2). On les retrouve également en quantité moindre dans les lacunes lysigènes précédemment décrites et dans les méats situés entre les cellules de l'endoderme et le parenchyme cortical (Fig. 2, 2, 5, 6).

De plus, l'observation au microscope électronique à transmission nous a permis de déterminer avec précision la présence de bactéries à l'intérieur des cellules de la dernière assise du parenchyme cortical située au contact de l'endoderme ainsi que dans les lacunes lysigènes



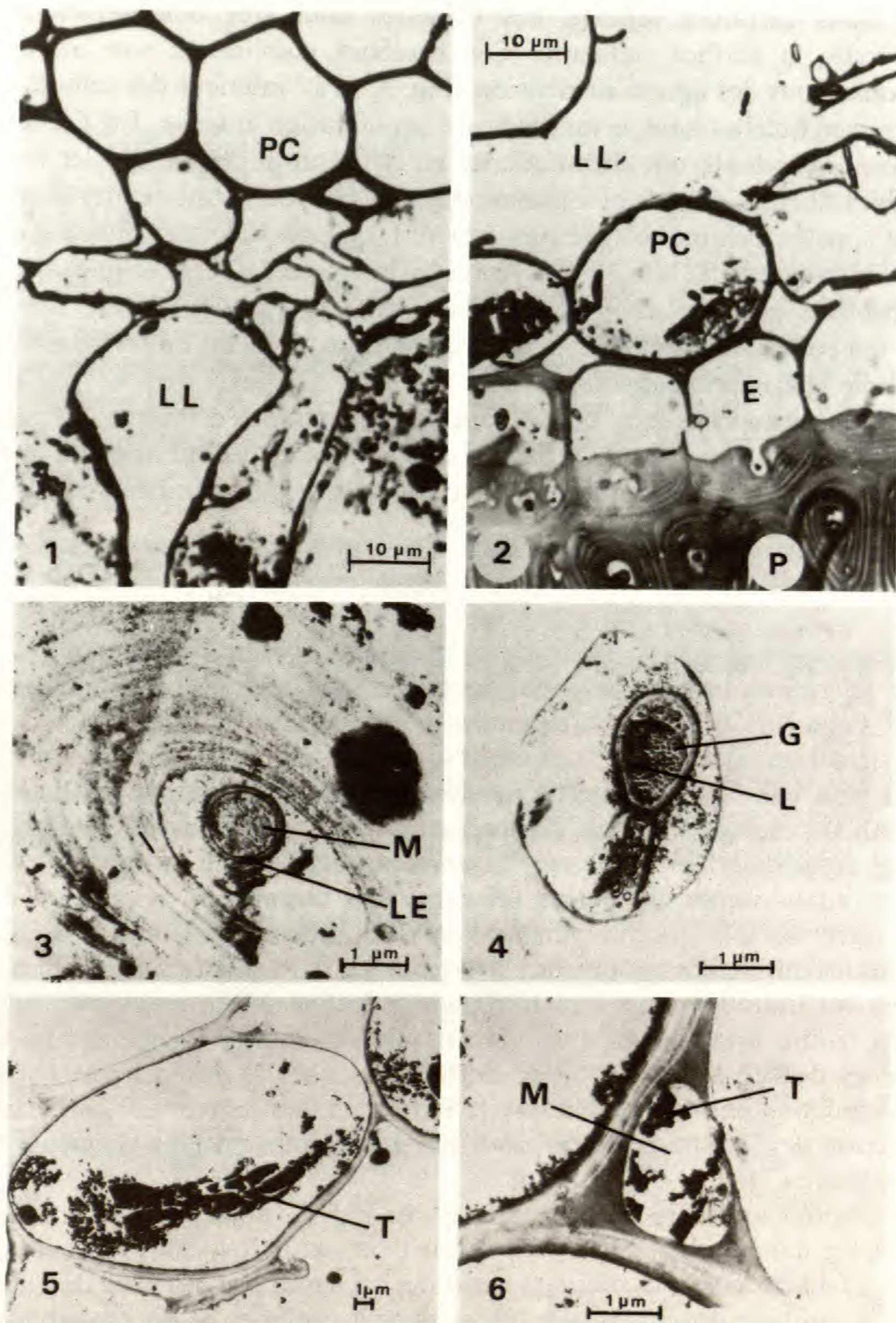


Fig. 2. — 1, section transversale semi-fine d'une racine de *Vetiveria zizanioides* après inclusion en résine hydrosoluble de lowicryl et coloration au bleu azur, vue détaillée au microscope optique du parenchyme cortical (PC) mettant bien en évidence les lacunes lysigènes (LL); 2, section transversale semi-fine traitée comme la coupe précédente (1), vue détaillée au microscope optique de la dernière couche du parenchyme cortical (PC), de l'endoderme (E) et du péricycle (P). — 3 à 6, sections transversales ultrafines de racines de *Vetiveria zizanioides* après inclusion en résine hydrosoluble de lowicryl et contrastées à l'acétate d'uranyl suivies de citrate de plomb, microphotos réalisées au M.E.T. ; 3, cellule de sclérenchyme avec des mitochondries (M) et des lamelles ergatoplasmiques (LE); 4, cellule de sclérenchyme avec des particules de glycogène en rosette (G) et des globules lipidiques (L); 5, cellule de la dernière couche du parenchyme cortical au contact de l'endoderme avec des huiles essentielles (T); 6, méat entre deux cellules de parenchyme cortical situées au contact de l'endoderme rempli d'huiles essentielles.



(Fig. 3, 1-4). Dans certaines cellules, ces bactéries sont très nombreuses et recouvrent pratiquement toute la surface cellulaire. Ces bactéries manifestent une activité mitotique puisque nous observons des figures de division (Fig. 3, 1) à l'intérieur des cellules de l'hôte. Ce qui tend à prouver qu'elles sont à un stade de prolifération intense. En l'absence de toute activité elles auraient adopté une forme dilatée en X ou en Y pour s'appeler bactéroïdes.

Les bactéries libérées dans le cytoplasme des cellules hôtes sont ceintes d'une membrane communément appelée membrane de séquestration. L'origine de cette membrane est clairement explicitée par TRUCHET en 1973 (p. 37-41). Après hydrolyse de la paroi cellulosique de la cellule végétale, la bactérie entraîne dans son déplacement vers le cytoplasme un fragment de plasmalemmes qui par la suite se détache et se referme sur lui-même en formant une enveloppe continue qui isole la bactérie entière.

De plus, dans plusieurs cellules nous avons noté la présence conjointe des bactéries et des huiles essentielles cristallisées (Fig. 3, 5, 6). Ces observations nous ont amené à nous demander s'il existe des relations entre ces bactéries et la synthèse suivie de la cristallisation de ces huiles essentielles.

## DISCUSSION — CONCLUSION

Si l'on se réfère aux travaux antérieurs concernant la structure anatomique de *Vetiveria zizanioides* on s'aperçoit que dans un premier temps les études ont été faites sur un plan strictement systématique (PRAT, 1937) en vue d'un classement de l'espèce et, dans un deuxième temps, sur un plan chimique en vue de localiser les cellules sécrétant les huiles essentielles (KARTUSCH & KARTUSCH, 1978). Les recherches de PRAT sur les Andropogonées d'Afrique, groupe auquel appartient le *Vetiveria zizanioides*, ont permis d'étudier des caractères histologiques et anatomiques des limbes foliaires. Plus récemment, KARTUSCH & KARTUSCH (1978) se sont intéressés à la structure anatomique de la racine dans le but de localiser les huiles essentielles dans les différentes régions de cet organe. Grâce à une technique mise au point par BERG (1951) ils ont traité les coupes anatomiques de Vétiver au benzopyrène, substance qui a la propriété de rendre fluorescente dans l'ultra violet les huiles essentielles. La sécrétion des huiles essentielles débute au niveau de la dernière couche du parenchyme cortical juste au contact de l'endoderme pour atteindre ensuite la totalité de l'écorce. La consistance de l'huile évolue en fonction de l'âge de la racine pour devenir de plus en plus visqueuse et former de véritables concrétions.

Nos observations au microscope optique et au M.E.T. nous ont aussi révélé la présence d'huiles essentielles dans toute l'écorce sous forme de cristaux très denses aux électrons (Fig. 2, 2, 5, 6 ; Fig. 3, 2). Des recherches ultérieures sur des racines d'âge différent devraient permettre de démontrer la synthèse des huiles essentielles dans les cellules. Il est probable que dans des cellules très jeunes, le contenu cellulaire serait plus facile à observer. D'après les travaux antérieurs sur la sécrétion des particules polyterpéniques entrant dans la composition des huiles essentielles, le site de synthèse serait dans le hyaloplasme, puis, à un stade plus avancé de la différenciation, des particules migreraient dans les vacuoles. Selon MARTY (1974, p. 254) : « tous les terpénoïdes paraissent être synthétisés à partir de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP) qui se révèle l'unité isoprénique d'intérêt biologique ».

La présence de bactéries dans des cellules produisant des huiles que nous a révélé



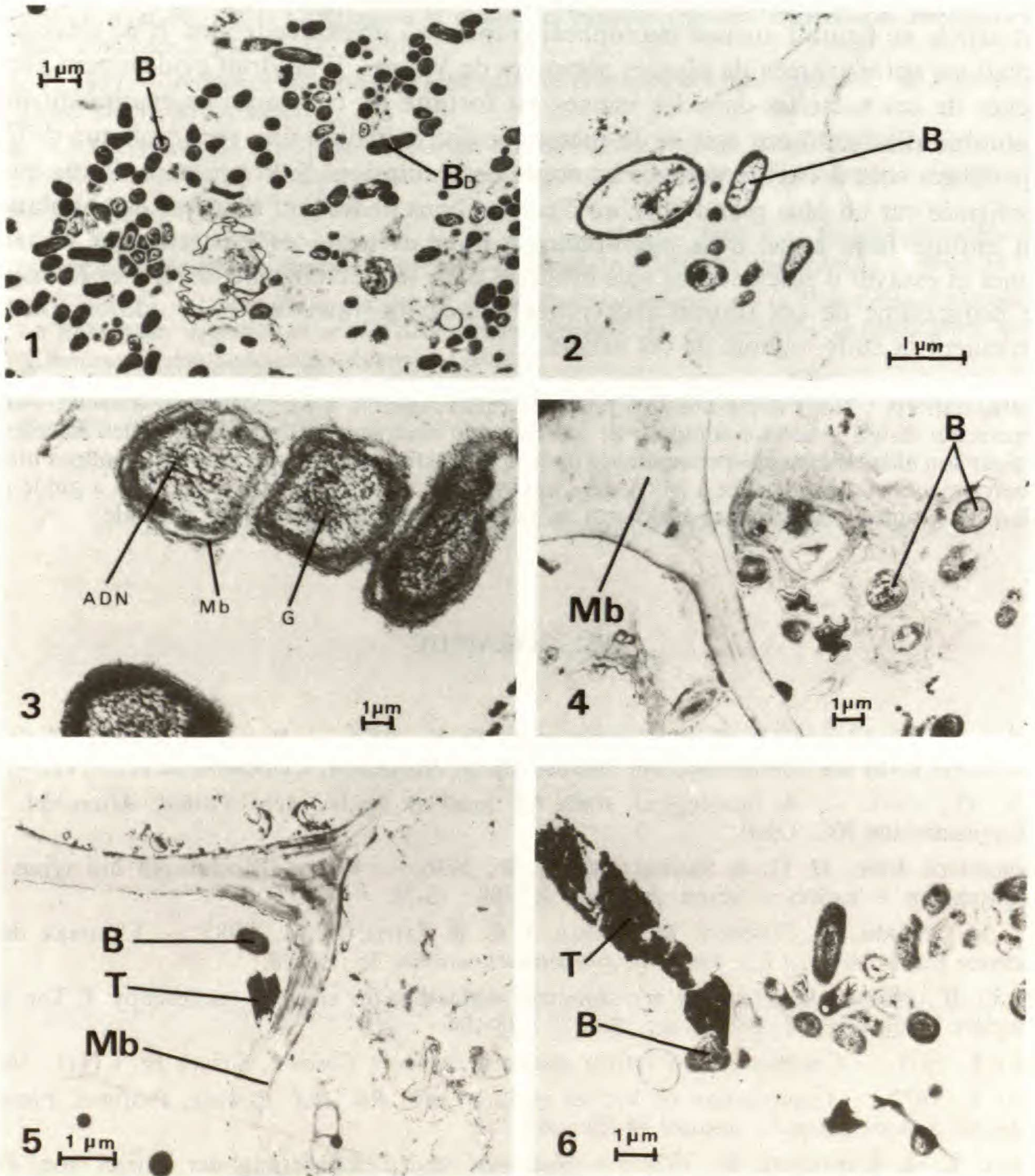


Fig. 3. — Coupes transversales ultrafines (M.E.T.) de racines de *Vetiveria zizanioides* après inclusion en résine hydro-soluble de lowicryl et contrastées à l'acétate d'uranyl suivies de citrate de plomb ; 1, cellule de l'écorce contenant des bactéries (B) dont certaines sont en train de se diviser (Bd) ; 2, méat entre deux cellules du parenchyme cortical contenant des bactéries ; 3, vue détaillée des bactéries avec le chromosome bactérien, la double membrane (Mb) et des grains de réserve (G) ; 4, bactéries dans une cellule du parenchyme cortical ; 5, cellule du parenchyme cortical contenant côte à côte des bactéries (B) et des huiles essentielles ; 6, bactérie accolée à des huiles essentielles cristallisées.



l'observation au microscope électronique à transmission constitue un fait nouveau particulièrement intéressant. Les auteurs précédents n'avaient pas mentionné l'existence de bactéries au niveau des racines. Par contre, au niveau des feuilles, SHANMUGANATHAN en 1974 a signalé que des bactéries pathogènes appartenant à l'espèce *Xanthomonas* provoquaient des nécroses mais dans cet article ne figurait aucune microphotographie au niveau cellulaire. Il ne s'agissait que d'observations après examen de plantes nécrosées de Vétiver. Il faudrait évidemment vérifier si la présence de ces bactéries dans les racines est fortuite ou constante en examinant un plus grand nombre d'échantillons soit de la même localité soit d'origine géographique différente. Ces expériences sont à l'heure actuelle en cours de réalisation. Si la présence de ces bactéries était confirmée sur un plus grand nombre d'échantillons provenant de diverses populations, il faudrait ensuite faire appel à la microbiologie pour extraire ces bactéries des racines, les déterminer et essayer d'élucider leur rôle éventuel dans le métabolisme des huiles essentielles.

Le programme de ces futures recherches microbiologiques est à l'étude et constituera éventuellement la suite logique de cet article.

REMERCIEMENTS : Nous adressons nos plus vifs remerciements à M<sup>me</sup> Monique HENRY, Maître de Conférences qui dirige le Service commun de Microscopie électronique de la Faculté des Sciences de St Jérôme pour son aide efficace et sa compétence dans la réalisation et l'interprétation des coupes ultrafines. Nos remerciements vont également à M<sup>r</sup> Alain GESLOT, Maître de Conférences qui nous a guidé pour la confection des coupes à la paraffine effectuées au laboratoire de Morphogénèse végétale.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALTMAN, L. G., SCHNEIDER, B. G. & PAPERMASTER, D. S., 1984. — Rapid embedding of tissues in Lowicryl K4M for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 32 (11) : 1217-1223.
- BERG, N. O., 1951. — A histological study of masked lipids. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Supplementum XC.* Lund.
- BUNGENBERG DE JONG, H. G. & SAUBERT, G. G. P., 1936. — Komplexflochungen des typus : kolloidzwitterion + kation + anion. *Biochem. Z.* 288 : 13-28.
- COLSSON, M., PERRIN, A., DERBESY, M., BAYLE, J. C. & TANTI, R. M., 1985. — L'essence de sauge sclarée (*Salvia sclarea* L.). *Parfums, cosmétiques, arômes* 66 : 53-58.
- DERMER, G. B., 1969. — The fixation of pulmonary surfactant for electron microscopy. I. The alveolar surface lining layer. *J. Ultrastruct. Res.* 27 : 88-104.
- GARNERO, J., 1971. — Composition of vetiver essences. *Parfums, Cosmet., Savons Fr.* 1 (11) : 569-589.
- GARNERO, J., 1972. — Composition of Vetiver essential oils. *Riv. Ital. Essenze, Profumé, Plante Off., Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol* 54 (5) : 315-336.
- KARTUSCH, R. & KARTUSCH, B., 1978. — Nachweis und Lokalisierung der wurzel von *Vetiveria zizanioides* L. *Mikroskopie (Wien)* 34 : 195-201.
- LUFT, J. H., 1961. — Improvement in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409-414.
- MARTY, F., 1974. — *Vacuome et Sécrétion intracellulaire chez Euphorbia characias* L. Thèse Doct. Marseille-Luminy.
- PERRIN, A. & COLSON, M., 1986. — L'appareil sécréteur des lavandes et lavandins. *Parfums, cosmétiques, arômes* 69 : 61-63.



- PRAT, H., 1937. — Caractères anatomiques et histologiques de quelques Andropogonées de l'Afrique occidentale. *Ann. Inst. Bot.-Géol. Colon. Marseille*, sér. 5, 5 : 25-28.
- REYNOLDS, E. S., 1963. — The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-212.
- SHANMUGANATHAN, N., 1974. — Attaques et nouveaux ennemis signalés. Flétrissures des pousses de Pin. *Bull. Phytosanit. F.A.O.* 22 : 94-96.
- SMADJA, J., 1987. — *Influence climatique et régionale sur la qualité de l'huile essentielle du Vétyver Bourbon*. Thèse Doct., Montpellier.
- SMADJA, J., GAYDOU, E. M., LAMATY, G. & CONAN, J. Y., 1986. — Huile essentielle de vétyver Bourbon : influence régionale et climatique sur les constantes physico-chimiques. *Parfums, cosmétiques, arômes* 69 : 69-73.
- SMADJA, J., GAYDOU, E. M., LAMATY, G. & CONAN, J. Y., 1988. — Essais d'identification des constituants de l'huile essentielle de vétyver Bourbon. *Parfums, cosmétiques, arômes* 84 : 61-66.
- TRUCHET, G., 1973. — *Contribution à l'étude des nodosités produites sur le Pois (Pisum sativum L.) par le Rhizobium leguminosarum. Etude infrastructurale et localisations enzymatiques. Notion de Symbiose*. Thèse Spécialité, Marseille-Luminy.
- WATSON, M. L., 1958. — Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 475-485.